

PROPERTY DOCUMENT

INPI

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIETE  
INDUSTRIELLEPARIS 14 FEB 1996  
WIPO PCT

08/860231

## BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef de Division



Yves CAMPENON

SIEGE  
INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIETE  
INDUSTRIELLE

26 bis, rue de Saint Petersbourg  
75800 PARIS Cedex 08  
Téléphone : (1) 42 94 52 52  
Télécopie : (1) 42 93 59 30

## REQUETE

EN DÉLIVRANCE D'UN  
TITRE DE PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE \*

1

a	<input checked="" type="checkbox"/> BREVET D'INVENTION
b	<input type="checkbox"/> CERTIFICAT D'UTILITÉ
c	<input type="checkbox"/> DEMANDE DIVISIONNAIRE
d	<input type="checkbox"/> TRANSPOSITION D'UNE DEMANDE DE BREVET EUROPÉEN

## 2 OPTIONS OBLIGATOIRES au moment du dépôt (sauf pour le certificat d'utilité)

SI LE DEMANDEUR REQUIERT L'ETABLISSEMENT DIFFERENT DU RAPPORT DE RECHERCHE

OUI

OUI

NON

NON

SI L'OPTION CHOISIE EST NON ET SI LE DEMANDEUR EST UNE PERSONNE PHYSIQUE, IL REQUIERT LE PAIEMENT ECHELONNÉ DE LA REDEVANCE DE RAPPORT DE RECHERCHE

NCN

NATURE

NUMERO

DATE DE LA DEMANDE INITIALE

DATE DE REMISE DES PIÈCES

29 JAN 1995

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

95 00327

DATE DE DÉPÔT

09 JAN 1995

CODE POSTAL DU LIEU DE DÉPÔT

dy

4 NUMERO DU POUVOIR PERMANENT

## 7 TITRE DE L'INVENTION

Milieu nutritif utilisable comme milieu de culture de cellules épidermiques  
et applications pharmaceutiques

## 8 DEMANDEUR(S) : Nom et Prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination et forme juridique

N° SIREN

1) THOREL Jean-Noël

2) SARL dite : SOCIETE D'EXPLOITATION FRANCAISE DES RECHERCHES BIODERMA

## 9 ADRESSE(S) COMPLÉTE(S)

1) 3 rue de la Rochelle - 75014 PARIS

PAYS

FRANCE

2) ZAC Pichaury II 6 Rue Pierre Berthier  
13290 LES MILLES

FRANCE

## 10 NATIONALITÉ(S)

1) et 2) Françaises

## 11 INVENTEUR(S)

LE DEMANDEUR EST L'UNIQUE INVENTEUR

OUI

12

SI LE DEMANDEUR EST UNE PERSONNE PHYSIQUE NON IMPOSABLE, IL REQUIERT OU A REÇU LA REDUCTION DES REDEVANCES\*

OUI

 DE DÉPÔT

REDEVANCES VERSEES

DE RAPPORT DE RECHERCHE

DE REVENDICATION DE PRIORITÉ

DE REVENDICATION (à partir de la 11e)

13 DECLARATION DE PRIORITÉ  
OU REQUETE DU BÉNÉFICE DE  
LA DATE DE DÉPÔT D'UNE  
DEMANDE ANTERIEURE

PAYS D'ORIGINE

DATE DE DÉPÔT

NUMERO

14

DIVISIONS

ANTÉRIEURES À LA PRÉSENTE DEMANDE

N°

N°

N°

N°

15 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE  
NOM ET QUALITÉ DU SIGNATAIRE V D'INSCRIPTIONDominique GUERRE  
CPI 921104

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RECEPTION

D. GIRARD

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE A L'INPI

Cocher la case choisie

LES ENCADRÉS GRAS SONT RÉSERVÉS A L'ADMINISTRATION

## Division Administrativ des Brev ts

## DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

N° d'enregistrement national

9500327

## Titre de l'invention :

Milieu nutritif utilisable comme milieu de culture de cellules épidermiques et applications pharmaceutiques

## Le (s) soussigné (s)

Cabinet GERMAIN & MAUREAU  
B.P. 3011

69392 LYON CEDEX 08  
FRANCE

désigne (nt) en tant qu'inventeur (s) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

THOREL Jean-Noël  
3 rue de la Rochelle  
75014 PARIS

GATTO Hugues  
15 rue Pasteur  
73200 ALBERTVILLE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

le 9 janvier 1995  
Dominique GUERRE  
CPI 921104

- sous forme émulsionnée, étant entendu que la force ionique de la phase discontinue implique l'instabilité de l'émulsion ; il est cependant possible de formuler des phases lamellaire ou cylindrique présentant 5 une meilleure stabilité, ou encore un système bi-phasique remis extemporanément en émulsion par simple agitation;

- par encapsulation :

\* dans une capsule rigide, du type polysaccharide, dispersée dans la phase lipidique,

10 \* dans une capsule molle, du type gélatine, dispersée dans la phase discontinue.

L'utilisation de liposomes comme vecteur d'encapsulation est envisageable sous forme d'un gel liposomal en phase continue aqueuse.

15 Une composition selon l'invention peut servir de base galénique, notamment nutritive. Son apport nutritionnel est notablement intéressant pour l'amélioration de la viabilité, le maintien de l'intégrité et l'équilibre des cellules cutanées superficielles.

20 De manière plus générale, une composition selon l'invention peut être incorporée dans toute préparation à usage galénique, en tant que principe actif avec éventuellement d'autres principes actifs, mais également comme excipient grâce à sa capacité à potentialiser 25 l'action de principes actifs spécifiques.

Un milieu nutritif complexe selon l'invention recrée un environnement extra-cellulaire adapté, en fournissant :

- un apport nutritionnel optimisé, aussi bien en 30 vitamines, oligo-éléments, qu'en acides aminés essentiels,  
- des facteurs de croissance cellulaire, visant à substituer les interactions cellulaires morphogènes,  
- et des caractéristiques de pH et d'osmolarité proches des conditions physiologiques.

35 Dans un médicament selon la présente invention, la phase biocompatible dans laquelle est distribué l'agent

nutritionnel peut constituer l'excipient, ou l'un des composants de l'excipient dudit médicament.

Ou encore, dans un médicament selon l'invention, l'agent nutritionnel ou milieu nutritif complexe peut 5 constituer le principe actif, ou au moins l'un des principes actifs dudit médicament, ou servir d'agent de potentialisation de l'action de principes actifs spécifiques.

Les caractéristiques, applications et avantages de 10 la présente invention sont exposés plus en détails dans les Exemples 1 et 2 et les figures 1 à 3 suivants.

L'Exemple 1 donne un exemple de formulation d'une composition de l'invention.

L'Exemple 2 met en évidence les propriétés d'une 15 composition de l'invention par rapport à des milieux connus, à l'appui du dessin annexé dans lequel :

Fig 1 est une vue en coupe d'épidermes humains après 36 heures de culture dans un milieu commercial standard dénommé MCDB 153, commercialisé notamment par 20 IRVINE SCIENTIFIC,

Fig 2 est une vue en coupe d'épidermes humains après 36 heures de culture dans une solution saline tamponnée (PBS), solution saline équilibrée couramment utilisée en culture cellulaire, et

25 Fig 3 est une vue en coupe d'épidermes humains en culture dans le milieu nutritif de l'invention, décrit à l'Exemple 1 à différents temps de culture :

A : au bout de 12 heures

30 B : au bout de 24 heures

C : au bout de 36 heures

Exemple 1:

Formulation d'une composition de l'invention

TABLEAU 1

COMPOSANTS	Concentration en mg/l.
<b>Acides aminés</b>	
L-Alanine	9,2
L-Arginine HCL	421,4
L-Asparagine (anhydre)	14,2
Acide L-aspartique	4,0
L-Cystéine HCL. H <sub>2</sub> O	42,0
Acide L-Glutamique	14,8
L-Glutamine	1754,4
Glycine	7,6
L-Histidine HCL. H <sub>2</sub> O	50,0
L-Isoleucine	6,0
L-Leucine	131,2
L-Lysine HCl	54,0
L-Méthionine	13,5
L-Phénylalanine	10,0
L-Proline	34,6
L-Sérine	126,1
L-Thréonine	24,0
L-Tryptophane	9,3
L-Tyrosine 2 Na 2H <sub>2</sub> O	11,7
L-Valine	70,3
<b>Vitamines et facteurs de croissance cellulaire</b>	
d-Biotine	0,02
Acide folique	0,80
Nicotinamide	0,04
D-Ca Pantothénate	0,30
Pyridoxine HCl	0,06
Riboflavine	0,04
Thiamine HCl	0,30
Vitamine B <sub>12</sub>	0,41
i-Inositol	18,0

Putrescine 2 HCl	0,20
Pyruvate de sodium	55,0
Thymidine	0,73
Adénine (HCl)	24,0
Acide DL-lipoïque	0,20

**Composants inorganiques**

Chlorure de sodium	6800,0
KCl	112,0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	284,0
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,003
Acétate de sodium	300,0 (anhydre)
D-Glucose	1080,0
HEPES (pipérazine)	6600,0
Phosphoryléthanolamine	0,06768
Ethanolamine	0,04684
Sulfate de sodium	3,4
Bicarbonate de sodium	1160,0
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,39
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	120,0
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	de 13,0 à 22,05
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,144
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MO <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,00120
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,142
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,00002
SnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,00011
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	0,00057

**Exemple 2:**

La cytocompatibilité et les performances du milieu nutritif complexe décrit à l'Exemple 1 ont été testées sur 5 des cultures de kératinocytes humains en monocouche, et sur des épidermes humains reconstitués *in vitro*.

Le milieu nutritif selon l'Exemple 1 permet la culture de kératinocytes en monocouche dans des conditions

optimales de viabilité, durant au moins 36 heures, sans que ne se manifeste le moindre effet cytotoxique.

A l'inverse, une solution de survie classique telle que le PBS (Phosphate Buffered Saline, solution saline équilibrée couramment utilisée en culture cellulaire) s'avère cytotoxique dès 12 heures d'incubation.

Conformément à la Fig 3, Le milieu nutritif selon l'exemple autorise une culture d'épidermes humains normaux 10 reconstitués dans des conditions optimales de viabilité, sans manifestations cytotoxiques même après 36 heures (Fig 3C) de mise en contact. Les cultures présentaient des couches cellulaires basales, spineuses, granuleuses et cornées intactes, orthokératosiques, de stratification 15 régulière et normale.

En comparant la Fig 3C avec la Fig 1, cette dernière illustrant l'utilisation d'un milieu commercial standard (MCDB 153, commercialisé notamment par IRVINE SCIENTIFIC), on voit que les performances du milieu de 20 l'invention sont aussi bonnes.

Par contre, l'utilisation de PBS induit, conformément à Fig 2, l'apparition de kératinocytes en phase terminale de différenciation au niveau des assises basales et spineuses, avec des signes de nécrose plus ou 25 moins prononcés. On note également un décollement total de l'épiderme, avec destructureuration complète des différentes assises kératinocytaires.

## REVENDICATIONS

1/ Utilisation pour l'obtention d'un médicament d'une composition à usage topique, comprenant une phase biocompatible avec les parties superficielles du corps humain, dans laquelle est distribué de manière homogène un agent nutritionnel desdites parties superficielles, consistant en un milieu nutritif complexe, comprenant des composés à la fois biocompatibles, bio-mimétiques et biodisponibles au niveau cutané, à l'exclusion de tout extrait biologique d'origine animale, ledit milieu nutritif complexe ayant une composition adaptée pour permettre, en dehors de la phase dans laquelle ledit milieu est distribué, une culture viable in vitro d'un inoculum de kératinocytes épidermiques humains, avec au moins une prolifération clonale de ces derniers au premier passage.

2/ Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que le milieu nutritif complexe comprend des acides aminés, au moins une vitamine, au moins un facteur de croissance cellulaire, et au moins un sel minéral.

3/ Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que le milieu nutritif complexe a la composition suivante, la concentration des composants étant exprimée en mg/l :

## Acides aminés

L-Alanine	9,2
L-Arginine HCL	421,4
L-Asparagine (anhydre)	14,2
Acide L-aspartique	4,0
L-Cystéine HCL. H <sub>2</sub> O	42,0
Acide L-Glutamique	14,8
L-Glutamine	1754,4
Glycine	7,6
L-Histidine HCL. H <sub>2</sub> O	50,0

L-Isoleucine	6,0
L-Leucine	131,2
L-Lysine HCl	54,0
L-Méthionine	13,5
L-Phénylalanine	10,0
L-Proline	34,6
L-Sérine	126,1
L-Thréonine	24,0
L-Tryptophane	9,3
L-Tyrosine 2 Na 2H <sub>2</sub> O	11,7
L-Valine	70,3

#### Vitamines et facteurs de croissance cellulaire

d-Biotine	0,02
Acide folique	0,80
Nicotinamide	0,04
D-Ca Pantothénate	0,30
Pyridoxine HCl	0,06
Riboflavine	0,04
Thiamine HCl	0,30
Vitamine B <sub>12</sub>	0,41
i-Inositol	18,0
Putrescine 2 HCl	0,20
Pyruvate de sodium	55,0
Thymidine	0,73
Adénine (HCl)	24,0
Acide DL-lipoïque	0,20

#### Composants inorganiques

Chlorure de sodium	6800,0
KCl	112,0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	284,0
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,003
Acétate de sodium	300,0 (anhydre)
D-Glucose	1080,0
HEPES (pipérazine)	6600,0

Phosphoryléthanolamine	0,06768
Ethanolamine	0,04684
Sulfate de sodium	3,4
Bicarbonate de sodium	1160,0
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,39
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	120,0
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	de 13,0 à 22,05
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,144
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MO <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,00120
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,142
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,00002
SnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,00011
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	0,00057

4/ Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que la composition est sous forme biphasique, avec une phase continue aqueuse contenant le milieu nutritif complexe, et notamment sous forme de gel aqueux, ou d'émulsion d'huile dans l'eau.

5/ Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que la composition est sous forme biphasique, avec une phase continue huileuse, notamment sous forme d'émulsion, la phase discontinue contenant le milieu nutritif complexe.

6/ Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que la phase biocompatible dans laquelle est distribué l'agent nutritionnel constitue l'excipient.

7/ Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que l'agent nutritionnel constitue l'un des, sinon le principe actif dudit médicament.

8/ Base galénique comprenant une phase biocompatible avec les parties superficielles du corps humain, dans laquelle est distribué de manière homogène un agent nutritionnel desdites parties superficielles, caractérisée en ce que l'agent nutritionnel consiste en un

milieu nutritif complexe, comprenant des composés à la fois biocompatibles, bio-mimétiques et biodisponibles au niveau cutané, à l'exclusion de tout extrait biologique d'origine animale, ledit milieu nutritif complexe ayant 5 une composition adaptée pour permettre, en dehors de la phase dans laquelle ledit milieu est distribué, une culture viable in vitro d'un inoculum de kératinocytes épidermiques humains, avec au moins une prolifération clonale de ces derniers au premier passage.

1/2

FIG 1



FIG 2

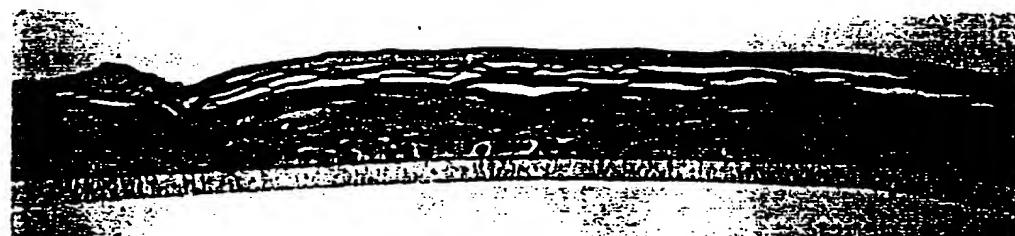


2/2

FIG 3



A



B



C